

09/926401

JCUS REG. NO. 26 OCT 2001

DOCKET NO.: 214887US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Markus OLES, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP00/01913

INTERNATIONAL FILING DATE: March 4, 2000

FOR: MODULAR CELL SUPPORT SYSTEMS FOR THREE-DIMENSIONAL CELL GROWTH

**REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Assistant Commissioner for Patents

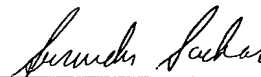
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 January 2001 (08.01.01)	Applicant's or agent's file reference O.Z. 5444-WO
International application No. PCT/EP00/01913	
International filing date (day/month/year) 04 March 2000 (04.03.00)	Priority date (day/month/year) 28 April 1999 (28.04.99)
Applicant OLES, Markus et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
21 November 2000 (21.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Nestor Santesso Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 14 SEP 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T5

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts O.Z. 5444-WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01913	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/04/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N5/00		
Anmelder CREAVIS GES. FÜR TECHNOLOGIE UND INNOVATION MBH		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 21/11/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Petri, B Tel. Nr. +49 89 2399 7356 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01913

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-9 eingegangen am 26/04/2001 mit Schreiben vom 25/04/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.
4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01913

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-9
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	keine
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	keine

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Zellträgersystem zur dreidimensionalen Kultur von Zellen. Das Trägersystem besteht aus einzelnen Modulen, die so zusammengesetzt werden können, daß eine dreidimensionale netzwerkartige- oder gitterförmige Trägerstruktur entsteht, auf der die Zellen organartige dreidimensionale Verbände bilden können. Die Trägerstruktur bildet dabei ein Hohlraumsystem (Kapillarsystem), über welches das Zellkulturmedium strömt. Die Wände des Trägersystems sind porös, sodaß eine Versorgung der Zellen gewährleistet ist.

2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-5 510 254 (NAUGHTON B.A. ET AL.) 23. April 1996 (1996-04-23) in der Anmeldung erwähnt.

D1 beschreibt ein dreidimensionales Zellkultursystem, in einem dreidimensionalen, schwammartigen Trägersystem, welches durch ein dreidimensionales Array von biokompatiblen nicht lebendigen Filamenten, und Zellen die Zwischenräume zwischen den Filamenten überbrücken gebildet wird. Das ganze System wird von Medium umspült bzw. durch das schwammartige Kapillarsystem (=Kapillarnetz) durchspült und erlaubt ein mehrschichtiges gewebeartiges/organähnliches Wachstum der Zellen (Abstrakt; Claim 1; Spalte 6, Linie 51-54). Ein modularer Aufbau ist nicht beschrieben.

D2: WO 97 12960 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10. April 1997 (1997-04-10).

D2 beschreibt ein Zellkultursystem mit einem dreidimensionalen Trägersystem, in das Hohlfasern eingelassen sind (z.B. Abstrakt). Das Zellkultursystem erlaubt das Ausbilden von gewebeartigen mehrlagigen Aggregaten (Fig. 13-14). Diese dreidimensionalen Trägersysteme (Module) können in Reaktoren übereinander gestapelt werden, sodaß größere dreidimensionale Objekte entstehen und durch die jeweiligen Platten (Halbschalen) kapillare Zwischenräume (=Kapillarnetz) entstehen, durch die das die Zellen versorgende Medium strömt (Abb. 2, 4, 10, 12).

D3: US-A-5 658 797 (BADER A.) 19. August 1997 (1997-08-19).

D3 beschreibt gestapelte "culture slides" (Module) mit kapillaren Zwischenräumen die ein zwischen jeweiligen Platten (Halbschalen) die ein Kapillarsystem (=Kapillarnetz) bilden, durch welches die Zellen mit Medium versorgt werden (Abb. 1,2, 4) und in organähnlichen Verbänden (Spalte 3, Ze 12-40) wachsen.

D4: US-A-5 605 835 (HU W. ET AL.) 25. Februar 1997 (1997-02-25)

D4 beschreibt ein dreidimensionales Zellkultursystem, in dem Module, bestehend aus einer Zellkammer in der Zellen in einer biokompatiblen dreidimensionalen Matrix wachsen, welche durch permeablen Membranen von Medienkammern (also aus Halbschalen aufgebaut), welche ein Kapillarsystem (=Kapillarnetz) bilden in denen Zellkulturmedium strömt, getrennt ist, Diese aus Halbschalen aufgebauten Segmente werden gestapelt in Bioreaktoren zu größeren dreidimensionalen Objekten zusammengefaßt (Abstakt, Abb. 1, Abb.. 5).

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die nach Artikel 19(1) PCT beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen sind unter Artikel 19(2) PCT gewährbar.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

3. Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als neu betrachtet werden (Artikel 33(2) PCT):

Die Obwohl die spezifischen Ausführungsbeispiele der vorliegenden Anmeldung (siehe Abb. 1-5) vom oben genannten verfügbaren Stand der Technik abgegrenzt zu sein scheinen, und auch vorteilhafte Eigenschaften wie hohe Flexibilität, dreidimensionales Wachstum, und gute Vaskularisierung plausibel sind, so spiegelt

sich dieses dennoch in den formulierten Ansprüchen nicht wieder.

Die technischen Merkmale wie "Zellträgersystem aus modular geformten Segmenten, aufgebaut aus Halbschalen, zu größeren 3D Objekten zusammensteckbar und ein künstliches Kapillarnetz bildend, welches eine nahezu natürliche Vaskularisierung ermöglicht" charakterisieren auch den Stand der Technik (D2-D4). Die Ansprüche 1-3 und 8-9, in der gegenwärtigen Form, schließen somit den Stand der Technik mit ein. Dieser umfaßt allgemein Zellträgersysteme aus porösen (= mit Poren, durchlässig, permeabel) Materialien, welche ein dreidimensionales Wachstum der Zellen erlauben, die aus standardisierten Einheiten (= modulare Segmente) bestehen, bei denen durch Kombination der Elemente Kapillaren (=Kapillarnetz) entstehen, durch welche das Medium die Zellen versorgt (vaskularisiert) (siehe D2-D4 unter Punkt 2).

Zu diskutieren, inwieweit die Merkmale der abhängigen Ansprüche 4-7 alleine Neuheit und Erfinderische Tätigkeit begründen könnten scheint bei der jetzigen Form der übergeordneten Ansprüche nicht angemessen. Zumal Merkmale wie Porengröße und Abstand zwischen den Modulen nur innerhalb des gesamt Konzepts ihre vorteilhaften Eigenschaften entfalten. Für sich genommen und/oder im Zusammenhang mit den Merkmalen der Bioreaktoren aus D2-D4 scheinen sie kaum einen Beitrag zu liefern. Zudem scheinen die spezifizierten Porenabstände und Größen auch durch die Verwendung von handelsüblichen Zellkultursubstraten / Membranen vorweggenommen zu sein.

O.Z. 5444

1

Patentansprüche:

1. Zellträgersystem aus porösen Materialien,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass das Zellträgersystem aus modular geformten Segmenten besteht, die ganz oder teilweise aus Halbschalen aufgebaut sind und die zu größeren dreidimensionalen Objekten zusammengesteckt werden, wodurch ein künstliches Kapillarnetz entsteht, das eine nahezu natürliche Vaskularisierung der Zellen ermöglicht.
- 10 2. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass je zwei modular geformte Segmente durch Kombination der Halbschalen ein Kapillarsystem bilden.
- 15 3. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Halbschale eines modular geformten Segments durch Kombination einer semipermeablen Membrane ein Kapillarsystem bildet.
- 20 4. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 µm aufweisen.
- 25 5. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet,
dass die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 µm aufweisen.
- 30 6. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5

O.Z. 5444

2

dadurch gekennzeichnet,
dass die modular geformten Segmente Abstandhalter mit einer Höhe von 20 bis 200 μm aufweisen.

- 5 7. Zellträgersystem nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Abstandhalter hohl sind und für einen Flüssigkeitstransport geeignet sind.
- 10 8. Verwendung der Zellträgersysteme gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung dreidimensionaler Zellgewebe.
9. Verwendung der Zellträgersysteme gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 für Bioreaktoren.

fj

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

al Application No

PCT/EP 00/01913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12M3/00 C12M3/06 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 510 254 A (NAUGHTON B.A. ET AL.) 23 April 1996 (1996-04-23) cited in the application the whole document	1-9
A	WO 97 12960 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10 April 1997 (1997-04-10) the whole document	1-9
A	US 5 658 797 A (BADER A.) 19 August 1997 (1997-08-19) the whole document	1-9
A	US 5 605 835 A (HU W. ET AL.) 25 February 1997 (1997-02-25) the whole document	1-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/EP 00/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5510254 A	23-04-1996	US 5443950 A	22-08-1995
		US 5266480 A	30-11-1993
		US 5032508 A	16-07-1991
		US 4963489 A	16-10-1990
		US 4721096 A	26-01-1988
		US 5624840 A	29-04-1997
		US 5849588 A	15-12-1998
		US 5962325 A	05-10-1999
		US 5460939 A	24-10-1995
		US 6022743 A	08-02-2000
		US 5580781 A	03-12-1996
		US 5516680 A	14-05-1996
		US 5512475 A	30-04-1996
		US 5541107 A	30-07-1996
		US 5516681 A	14-05-1996
		US 5578485 A	26-11-1996
		US 5785964 A	28-07-1998
		US 5518915 A	21-05-1996
		US 5902741 A	11-05-1999
		US 5863531 A	26-01-1999
		US 5858721 A	12-01-1999
		AU 644578 B	16-12-1993
		AU 4211489 A	02-04-1990
		BR 8907642 A	20-08-1991
		CA 1335657 A	23-05-1995
		DK 40591 A	07-05-1991
		EP 0358506 A	14-03-1990
		HU 56393 A	28-08-1991
		IL 91536 A	31-10-1996
		JP 4501657 T	26-03-1992
		KR 156571 B	15-10-1998
		KR 156684 B	15-10-1998
		KR 156685 B	15-10-1998
		NO 910787 A	22-04-1991
		NZ 230572 A	23-12-1993
		PT 91676 A	30-03-1990
		WO 9002796 A	22-03-1990
		US 5160490 A	03-11-1992
		ZA 8906886 A	27-06-1990
		AT 127692 T	15-09-1995
		AU 6815990 A	14-03-1991
		AU 6816090 A	14-03-1991
		AU 615414 B	03-10-1991
		AU 7356887 A	09-11-1987
		BG 51337 A	15-04-1993
		BR 8707673 A	15-08-1989
		CA 1310926 A	01-12-1992
		DE 3751519 D	19-10-1995
		DK 665687 A	17-12-1987
WO 9712960 A	10-04-1997	AU 714517 B	06-01-2000
		AU 7148296 A	28-04-1997
		EP 0866849 A	30-09-1998
		JP 11514229 T	07-12-1999
US 5658797 A	19-08-1997	DE 4206585 A	09-09-1993
		AT 131867 T	15-01-1996
		AU 668922 B	23-05-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5658797 A		AU 3745693 A	05-10-1993
		CA 2129648 A	16-09-1993
		DE 59301218 D	01-02-1996
		DK 629237 T	09-04-1996
		WO 9318133 A	16-09-1993
		EP 0629237 A	21-12-1994
		ES 2083851 T	16-04-1996
		GR 3019255 T	30-06-1996
		JP 7504325 T	18-05-1995
		NO 943242 A	01-09-1994
US 5605835 A	25-02-1997	US 5595909 A	21-01-1997
		US 5981211 A	09-11-1999
		AT 120485 T	15-04-1995
		DE 68921974 D	04-05-1995
		DE 68921974 T	03-08-1995
		EP 0380610 A	08-08-1990
		JP 2835629 B	14-12-1998
		JP 3505965 T	26-12-1991
		KR 131822 B	11-04-1998
		WO 8911529 A	30-11-1989
		AU 9031591 A	26-05-1992
		WO 9207615 A	14-05-1992

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/66712 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 3/00,
3/06, C12N 5/00

LANDWEHR, Dierk [DE/DE]; Haverlandweg 150,
D-48249 Dülmen (DE). KOSSMANN, Beate [DE/DE];
Ribbertstrasse 13, D-58091 Hagen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01913

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. März 2000 (04.03.2000)

(74) Gemeinsamer Vertreter: CREAVIS GESELLSCHAFT
FÜR TECHNOLOGIE UND INNOVATION MBH;
Patente - Marken, Bau 1042 - PB 15, D-45764 Marl (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US, ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 19 242.1 28. April 1999 (28.04.1999) DE

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): CREAVIS GESELLSCHAFT FÜR TECH-
NOLOGIE UND INNOVATION MBH [DE/DE];
Paul-Baumann-Strasse 1, D-45772 Marl (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 19. April 2001

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): OLES, Markus
[DE/DE]; Im Mühlenwinkel 2, D-45525 Hattingen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 00/66712 A3

(54) Title: MODULAR CELL CARRIER SYSTEMS FOR THE THREE-DIMENSIONAL CELL GROWTH

(54) Bezeichnung: MODULARE ZELLTRÄGERSYSTEME FÜR DREIDIMENSIONALES ZELLWACHSTUM

(57) Abstract: The invention relates to cell carrier systems consisting of half-shells of a porous material. Said half-shells can form a capillary system by means of combination with each other or with a semipermeable membrane. The cell carrier systems can be used for the cultivation of eucaryotic or organic stem cells or for bioreactors.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellträgersysteme aus Halbschalen eines porösen Materials. Die Halbschalen können durch Kombination untereinander oder mit einer semipermeablen Membran ein Kapillarsystem bilden. Die Zellträgersysteme können zur Kultivierung von eukaryontischen oder organischen Stammzellen bzw. für Bioreaktoren verwendet werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: al Application No

PCT/EP 00/01913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12M3/00 C12M3/06 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 510 254 A (NAUGHTON B.A. ET AL.) 23 April 1996 (1996-04-23) cited in the application the whole document	1-9
A	WO 97 12960 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10 April 1997 (1997-04-10) the whole document	1-9
A	US 5 658 797 A (BADER A.) 19 August 1997 (1997-08-19) the whole document	1-9
A	US 5 605 835 A (HU W. ET AL.) 25 February 1997 (1997-02-25) the whole document	1-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5658797 A		AU 3745693 A	05-10-1993
		CA 2129648 A	16-09-1993
		DE 59301218 D	01-02-1996
		DK 629237 T	09-04-1996
		WO 9318133 A	16-09-1993
		EP 0629237 A	21-12-1994
		ES 2083851 T	16-04-1996
		GR 3019255 T	30-06-1996
		JP 7504325 T	18-05-1995
		NO 943242 A	01-09-1994
US 5605835 A	25-02-1997	US 5595909 A	21-01-1997
		US 5981211 A	09-11-1999
		AT 120485 T	15-04-1995
		DE 68921974 D	04-05-1995
		DE 68921974 T	03-08-1995
		EP 0380610 A	08-08-1990
		JP 2835629 B	14-12-1998
		JP 3505965 T	26-12-1991
		KR 131822 B	11-04-1998
		WO 8911529 A	30-11-1989
		AU 9031591 A	26-05-1992
		WO 9207615 A	14-05-1992

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12M3/00 C12M3/06 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 510 254 A (NAUGHTON B.A. ET AL.) 23. April 1996 (1996-04-23) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-9
A	WO 97 12960 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10. April 1997 (1997-04-10) das ganze Dokument	1-9
A	US 5 658 797 A (BADER A.) 19. August 1997 (1997-08-19) das ganze Dokument	1-9
A	US 5 605 835 A (HU W. ET AL.) 25. Februar 1997 (1997-02-25) das ganze Dokument	1-9

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5658797 A		AU 3745693 A	05-10-1993
		CA 2129648 A	16-09-1993
		DE 59301218 D	01-02-1996
		DK 629237 T	09-04-1996
		WO 9318133 A	16-09-1993
		EP 0629237 A	21-12-1994
		ES 2083851 T	16-04-1996
		GR 3019255 T	30-06-1996
		JP 7504325 T	18-05-1995
		NO 943242 A	01-09-1994
US 5605835 A	25-02-1997	US 5595909 A	21-01-1997
		US 5981211 A	09-11-1999
		AT 120485 T	15-04-1995
		DE 68921974 D	04-05-1995
		DE 68921974 T	03-08-1995
		EP 0380610 A	08-08-1990
		JP 2835629 B	14-12-1998
		JP 3505965 T	26-12-1991
		KR 131822 B	11-04-1998
		WO 8911529 A	30-11-1989
		AU 9031591 A	26-05-1992
		WO 9207615 A	14-05-1992

Modulare Zellträgersysteme für dreidimensionales Zellwachstum

Die vorliegende Erfindung betrifft künstliche Zellträgersysteme für ein dreidimensionales Zellwachstum und deren Verwendung.

5

Die Kultivierung von tierischen, humanen und im zunehmenden Maße auch pflanzlichen Zellen wird heute für eine Vielzahl von Aufgaben eingesetzt. Hierzu zählen neben wissenschaftlichen Zwecken und pharmakologischen Untersuchungen auch zunehmend biotechnische Anwendungen wie die Produktion von Antikörpern und Pharmazeutika. All diesen
10 Anwendungen liegt ein zweidimensionales Wachstumsverhalten der Zellen zugrunde, da mit den meisten Zellkultur-Techniken nur eine Zellschicht (Monolayer) gezüchtet werden kann.

Während der seriellen Subkultivierung von Zellen oder Primärkulturen wird häufig eine Veränderung in der Genexpression festgestellt. Dies gilt auch für viele immortalisierte
15 Zelllinien, die häufig nur noch einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Differenzierung zeigen. Neben der genetischen Instabilität gibt es weitere Ursachen für diese Differenzierung in vitro. Im natürlichen Gewebeverband (in vivo) wachsen die Zellen in einer räumlich hoch strukturierten Umgebung. Hierdurch ergeben sich andere Zell-Interaktionen, die eine völlig andere Zellaktivität und Proliferation zur Folge haben. Ein weiteres, sehr wichtiges Merkmal
20 des natürlichen Gewebeverbandes ist die Vaskularisierung. Es handelt sich hierbei um ein dichtes Netz von Blutgefäßen (Kapillaren und Venolen) mit denen die Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren und Sauerstoff sichergestellt wird.

Diese Erkenntnis hat zu verfeinerten Zellkulturtechniken geführt, die näher an der natürlichen
25 Umgebung (in vivo) orientiert sind und die extrazelluläre Matrix (ECM) mit in das in vitro System einbeziehen.

In-vitro-Zellkulturen wachsen häufig nur zweidimensional (Monolayer). Ein mehrlagiges Wachstum ist nicht nur zum Aufbau von dickeren Schichten erwünscht, sondern auch, um
30 einen funktionsfähigen Zellverband wie z.B. ein Organ zu erhalten. Zellverbände weisen neben einer hohen Zelldichte Interaktionen zwischen den Zellen oder anderen Geweben auf. Diese

Bisher konnten mit diesen Konzepten keine funktionellen Gewebe- oder Organverbände gezüchtet werden. Bei Verwendungszwecken, die einen höheren Differenzierungsgrad und dickere Zellschichten erforderten, wie beispielsweise Bindegewebe oder künstliche Organe, versagten diese Techniken. Ein Grund dafür ist die nicht zu gewährleistende Versorgung dicker
5 Zellschichten mit Nährmedien und Sauerstoff, wie es in vivo durch eine Vaskularisierung des Gewebes sichergestellt wird. Eine Versorgung der Zellen über interzelluläre Wege mit Sauerstoff und Nährstoffen ist nur über wenige Zellen bzw. Zellschichten möglich.

Der Einsatz von semipermeablen Membranen schaffte hier zum Teil Abhilfe. Ein System, das
10 den Einsatz von Polymervliesen als Trägersystem in Verbindung mit einer Perfusionskammer nutzt, wird beispielsweise von M. Sittinger et al. in "The International Journal of Artificial Organs" 1997, Vol.20 No.1, S. 57-62 beschrieben. Auf großen Vlies-Flächen werden hier Knorpel im ersten Schritt zu einem möglichst konfluenten Monolayer gezüchtet. Danach werden die Zellen in ein Perfusionskultursystem eingebracht. In diesen Kammern können
15 Knorpelzellen gut wachsen, da hier ein für diesen Gewebetyp ausreichender Austausch von Nährstoffen und Abfallprodukten gewährleistet ist. Die Grenzen dieser Technik sind aber auch nach wenigen Zellschichten erreicht, so daß Gewebearten, die eine intensive Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff benötigen, hiermit nicht gezüchtet werden können.

20 Durch geeignetes übereinanderschichten einzelner Membranen kann ebenfalls eine annähernd dreidimensionale Struktur geschaffen werden. Der Nachteil dieser Struktur ist aber, daß sie nicht selbst tragend ist, schlecht bzw. nur bis zu einer kleinen Höhe stapelbar und die Nährstoffversorgung durch die aufeinander liegenden Membranbahnen schwierig zu kontrollieren ist.

25 Weiterhin stehen die einzelnen Zellschichten nicht miteinander in Kontakt, es liegen somit aufeinander gestapelte zweidimensionale Schichten und keine dreidimensionale Struktur vor.

J. C. Hager et al. beschreiben in J. Natl. Cancer Inst., 69, 6 (1982) ein System von geordneten
30 Bündeln aus Hohlfasern zur Züchtung von Tumorzellen. Diese Fasern dienen als Oberfläche für die Zelladhäsion und, über Poren in den Fasern, als Versorgungsweg für die Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff. Mit ihnen kann ein dreidimensionales Zellwachstum erreicht

Die Porosität der modular geformten Segmente kann gezielt an den verwendeten Zelltyp angepaßt werden. Die modular geformten Segmente können je nach Zelltyp Poren mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 µm aufweisen. Die Verteilung der Poren wird vorteilhaft so gewählt, daß zwischen einer und drei Poren pro angewachsener Zelle für die Versorgung der Zellen bereitstehen, d.h. die Segmente besitzen vorteilhaft Poren mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 µm. Die Segmente der Zellträger besitzen ganz oder teilweise eine poröse Struktur, wobei ein gezieltes Zellwachstum vorzugsweise nur an den porösen Stellen der Segmente erfolgt.

- 10 Die nicht-porösen Stellen der Segmente können durch das hier verminderte Zellwachstum für Befestigungszwecke o. ä. eingesetzt werden.

Das auf den erfindungsgemäßen Zellträgersystemen gezüchtete Zellgewebe ist aufgrund der hervorragenden Vaskularisierung in vitro und in vivo proliferationsfähig. Durch die modulare Form der Segmente können Zellträgersysteme mit nahezu beliebiger Form und Komplexität aufgebaut werden. Die optionale Verbindung zwischen zwei oder mehreren Segmenten ermöglicht die Züchtung von praktisch beliebig großen, zusammenhängenden Zell- und Gewebekulturen.

- 20 Zellträgersysteme gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglichen den Aufbau von dreidimensionalen Zellgeweben, in dem alle Zellen über eine poröse und damit mikrostrukturierte Oberfläche mit Nährlösung und Sauerstoff versorgt werden können.

Die Versorgung der Zellen auf den erfindungsgemäßen Zellträgersystemen erfolgt über ein Kapillarsystem, das durch Kombination der Halbschalen je zwei modular geformter Systeme gebildet werden kann. Die Segmente können in einer Weise kombiniert werden, daß aus den beiden Halbschalen ein geschlossener Hohlkörper, d.h. ein Kapillarsystem entsteht. Die Kombination von zwei Segmenten kann durch entsprechende Haltestifte vereinfacht werden. Die Kapillaren weisen bevorzugt einen Durchmesser von 20-70 µm auf.

modular geformten Segmente weisen bevorzugt Abstandhalter mit einer Höhe von 20 bis 200 μm auf. Sofern die Abstandhalter hohl und für einen Flüssigkeitstransport geeignet sind, kann so die Nährlösung durch das gesamte System geführt werden.

- 5 Die modulare Ausführung der Segmente bewirkt ein Minikry der natürlichen Umgebung der Zellen, so daß eine Proliferation, Differenzierung oder die Ausführung der physiologischen Funktionen der Zellen so lange erfolgt, wie die Zellen mit Nährlösung durch das poröse Material versorgt werden können. Diese Versorgung erfolgt in der Regel über 2 bis 20 Zellschichten, wobei die Anzahl der versorgten Zellschichten stark vom Stoffwechsel der
- 10 Zellen abhängt. Leber- und Nierenzellen müssen auf Zellträgersystemen mit kleinen Abständen (20-40 μm) gezüchtet werden, da sie auch im Körper eine hohe Blutversorgung benötigen. Der Abstand der Zellträgersysteme bei Fibroblasten und Knorpelzellen kann dagegen sehr groß, bis zu 200 μm , sein.
- 15 Die einzelnen Segmente können mittels der Mikrosystemtechnik hergestellt werden. Ein geeignetes Verfahren ist beispielsweise das LIGA-Verfahren, einem Strukturierungsverfahren, das auf Grundprozessen der Röntgen-Lithographie, Galvanik und Abformung beruht. Mit den durch LIGA-Technik hergestellten Formeinsätzen können dann im Spritzguß, Reaktionsharzguß oder durch Prägeverfahren beliebig viele Kopien aus diversen Kunststoffen
- 20 mit hoher Detailtreue und mit relativ geringen Kosten hergestellt werden. Die Poren können durch geeignete Dornfortsätze an den Formeinsätzen in das Material eingebracht werden.

Fig. 2 zeigt beispielhaft den Aufbau eines erfindungsgemäßen Zellträgers aus zwei Segmenten. Ein Segment besteht aus einem zentralen Versorgungsrohr, von dem senkrecht, in periodisch

25 sich wiederholenden Abständen, Abzweigungen abgehen. Diese Abzweigungen bilden ein Kapillarsystem. Die Oberfläche der Segmente sind mit kleinen Poren versehen, die abhängig vom verwendeten Zelltyp einen Durchmesser von 0,5-5 μm besitzen. Die Poren besitzen einen mittleren Abstand von 1 bis 10 μm ; der Abstand der Abzweigungen zueinander (L1) kann dem Zelltyp angepaßt zwischen 20 und 200 μm betragen.

30

Durch das zentrale Versorgungsrohr wird das Nährmedium aktiv oder passiv durch ein entsprechendes Gefälle gepumpt. Die Verteilung des Nährmediums und der Atemgase zum

erweitert, um auch hier eine Zellschicht anwachsen zu lassen. Das sukzessive Vorgehen hat den Vorteil, das durch unterschiedliche Abstände der Segmente bzw. der Trägerschichten auch eine unterschiedliche Differenzierung eines Zelltyps erzwungen werden kann. Die unterschiedliche Differenzierung eines Zelltyps ist z. B. bei Hautzellen von Bedeutung. In der
5 Praxis haben sich Segmentabstände von 3-6 Zellagen bewährt.

Die erfindungsgemäßen Zellträger ermöglichen eine gute Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Dies kann durch eine Verästelung der Segmente erreicht werden. Fig. 4 a bis e zeigt eine beispielhafte Ausführung eines solchen Systems, basierend auf einer Wabenstruktur.
10 In dieses System wird durch einen Zulauf Nährmedium gepumpt. Über den Abfluß kann das Medium ablaufen und wieder dem Kreislauf zugeführt werden oder zur Weiterverarbeitung/Entsorgung gesammelt werden. Die Oberfläche der Segmente ist mit kleinen Poren mit Größe und Verteilung wie bereits beschrieben, versehen. Durch Kombination der Segmente entsteht auch bei dieser Ausführungsvariante ein künstliches Kapillarnetz.

15

Der Durchmesser der einzelnen Waben („Schlüsselweite“) ist abhängig vom verwendeten Zelltyp und kann zwischen 70 und 180 µm betragen. Um eine optimale Versorgung der Zellen sicherzustellen, kann der nächste wabenförmige Zellträger um 90 Grad (Fig. 4 c) gedreht über den vorhergehenden Zellträger gestapelt werden.

20

Wie bei der leiterförmigen Struktur beschrieben, kann auch mit wabenförmigen Segmenten eine dreidimensionale Zellkultur aufgebaut werden. Auch hier ermöglichen entsprechend ausgeführte Steckverbindungen zwischen den Waben ein schichtübergreifendes Zellwachstum (Fig. 4 e).

25

Die wabenförmigen Zellträger sind, wie in Fig. 1 skizziert, aus zwei fest miteinander verbundenen Halbschalen oder einer Halbschale und einer Membrane aufgebaut.

Die erfindungsgemäßen Zellträger können auch aus eher flächigen Segmenten aufgebaut
30 werden. Fig. 5 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Zellträgers in einer pyramidenförmigen Ausführung in der Auf- (Fig. 5 a) und Seitenansicht (Fig. 5 b und c). Die Segmente sind in parallel geführten Reihen periodisch angeordnet (Fig. 5 c und d). Zwischen

Alternativ zu den aus zwei Halbschalen aufgebauten Zellträgersystemen können diese auch durch Kombination einer Halbschale eines modular geformten Segments mit einer semipermeablen Membrane unter Aufbau eines Kapillarsystems gebildet werden. Hierbei wird auf der Rückseite eines Segments eine permeable Membrane gespannt. Durch geeignete Ätzverfahren können die überstehenden Membranteile entfernt werden. Diese Technik hat den Vorteil, daß nicht zwei Segmente passgenau zusammengesetzt werden müssen. Semipermeable Membran wie Gorotex, Simpatex oder keramische Membranen sind hierfür geeignet. Als bevorzugtes Ätzverfahren hat sich Plasmaätzen erwiesen. Es handelt sich hierbei um eine Trockenätzvariante, die bei der Herstellung von Strukturen im μm -Bereich genutzt wird. Nach dem Aufbringen durch Phaseninversionsprozeß der Membrane auf die Rückseite eines Segmentes werden in einem Plasmareaktor mit Plasmagasen wie F_2 , Cl_2 , CF_3^+/F , CCl_3^+/Cl und O_2 die überstehenden Membranteile weggeätzt. Auch diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erzeugt letztendlich geschlossene Hohlräume bzw. Kapillare. Die Porengröße und Verteilung der Membranen entspricht denen der Segmente mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 μm und einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 μm .

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der dreidimensionalen Zellträgersysteme für Bioreaktoren und zur Kultivierung von eukaryontischen oder organischen Stammzellen.

Wichtige Stammzellen sind Heptozyten, Nierenzellen, Endothelzellen, Epithelzellen oder Myozyten.

In der Biotechnologie werden zur Produktion von Hormonen, Cytokinen und anderen gentechnisch herstellbaren Arzneimitteln Zellkulturen verwendet, deren Erbgut so verändert wurde, daß sie zur Produktion der gewünschten Stoffe in der Lage sind. Da diese Zellen bisher fast ausschließlich in zweidimensionalen Kulturen gezüchtet werden, differenzieren diese Zellen sehr schnell. Dies hat zur Folge, daß die gewünschten Stoffe von der Zelle nicht sehr lange produziert werden und die Zellen ausgetauscht oder das Erbgut der Zellen erneut verändert werden muß. Der Einsatz der erfindungsgemäßen, dreidimensionalen Zellträgern zur Kultivierung bietet den Vorteil, daß der Phänotyp der eingesetzten Zellen weitgehend erhalten

Schutz vor Infektionen wird das System durch eine äußere Verkapselung geschlossen. Der Blutkreislauf eines Patienten kann dann über den nach außen zugeführten Zu- und Ablauf abgeschlossen werden. Im Reaktor übernehmen die Zellen dann die Funktion der Leber. Mit dieser Technik können auch andere künstliche Organe wie z. B. eine Niere aufgebaut werden.

5

Humane Nierenzellen können heute bereits gut in Kultur gehalten werden. Bisher scheiterte der funktionelle Einsatz dieser Zellen im Bereich der Dialyse aber an der Nachbildung von Nephronen in Verbindung mit funktionell differenzierten Nierenzellen. Durch die Kombination von Mikrosystemtechnik und Zellkulturtechnik ist es möglich, solche funktionellen Einheiten der Niere nachzubilden. Hierfür sind allerdings zwei getrennte Kreislaufsysteme, ein System für den Harn und ein System für den Blutkreislauf, nötig. Auch hier muß eine geeignete Verkapselung geschaffen werden.

Weitere Einsatzgebiete für die Verwendung der erfindungsgemäßen Zellträger sind Langerhansche Inselzellen des Pankreas, deren Funktion bei Diabetikern eingeschränkt ist. Bringt man gesunde Zellen dieses Types auf ein Gerüst von Zellträgern, kann künstlich Insulin erzeugt werden. Die Zellträger werden mit den Blutkreislauf des Patienten verbunden. Wie bei der Verwendung als Organersatz muß das System durch eine äußere Verkapselung geschlossen werden.

20

Die Nachbildung von künstlichen Gewebe und Gewebeersatz auf erfindungsgemäßen Zellträgern bietet bei der Toxizitätsprüfung entscheidende Vorteile. Für die Nachbildung der Haut ist eine Verkapselung nicht notwendig. In Nachahmung des anatomischen Vorbildes muß bei der Züchtung von künstlicher Haut die Blutversorgung zur Lederhaut hin immer mehr abnehmen. Technisch kann dies durch immer größer werdende Abstände der Segmente in der Zellkultur erreicht werden. Da die künstliche Vaskularisierung durch diese Bauweise in genau definierten Zellschichten liegen, kann dies auch für Penetrationsversuche genutzt werden. Für solche Untersuchungen muß die Versorgung der Elemente in der Zellkultur aber schichtweise vorgenommen werden, so daß nur in der gewünschten Zellschicht Nährmedium zur Analyse entnommen werden kann.

30

Patentansprüche:

1. Zellträgersystem aus porösen Materialien,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Zellträgersystem aus modular geformten Segmenten besteht, die ganz oder teilweise aus Halbschalen aufgebaut sind.
2. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß je zwei modular geformte Segmente durch Kombination der Halbschalen ein Kapillarsystem bilden.
3. Zellträgersystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß eine Halbschale eines modular geformten Segments durch Kombination mit einer semipermeablen Membrane ein Kapillarsystem bildet
4. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 bis 5 μm aufweisen.
5. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die modular geformten Segmente Poren mit einem mittleren Abstand von 1 bis 10 μm aufweisen.
6. Zellträgersystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die modular geformten Segmente Abstandhalter mit einer Höhe von 20 bis 200 μm aufweisen.

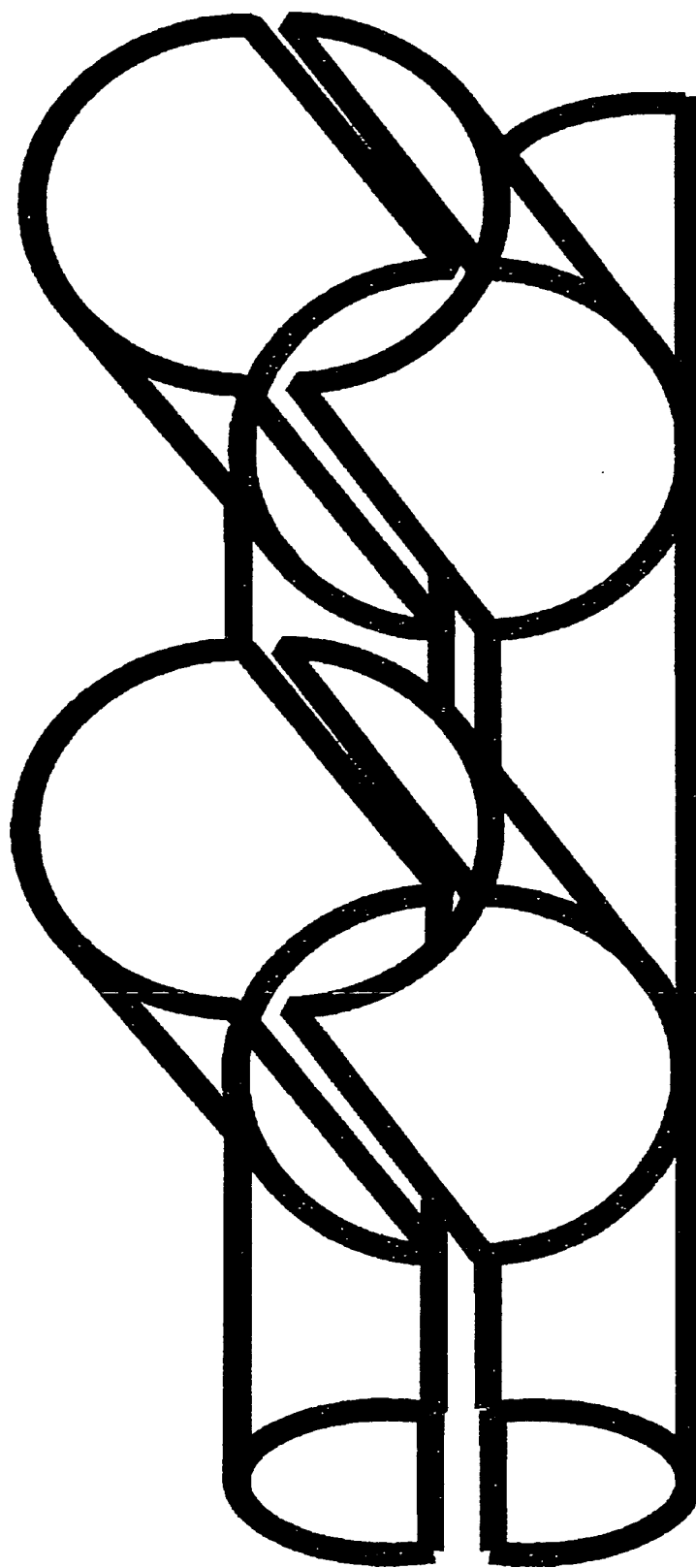


Fig. 1

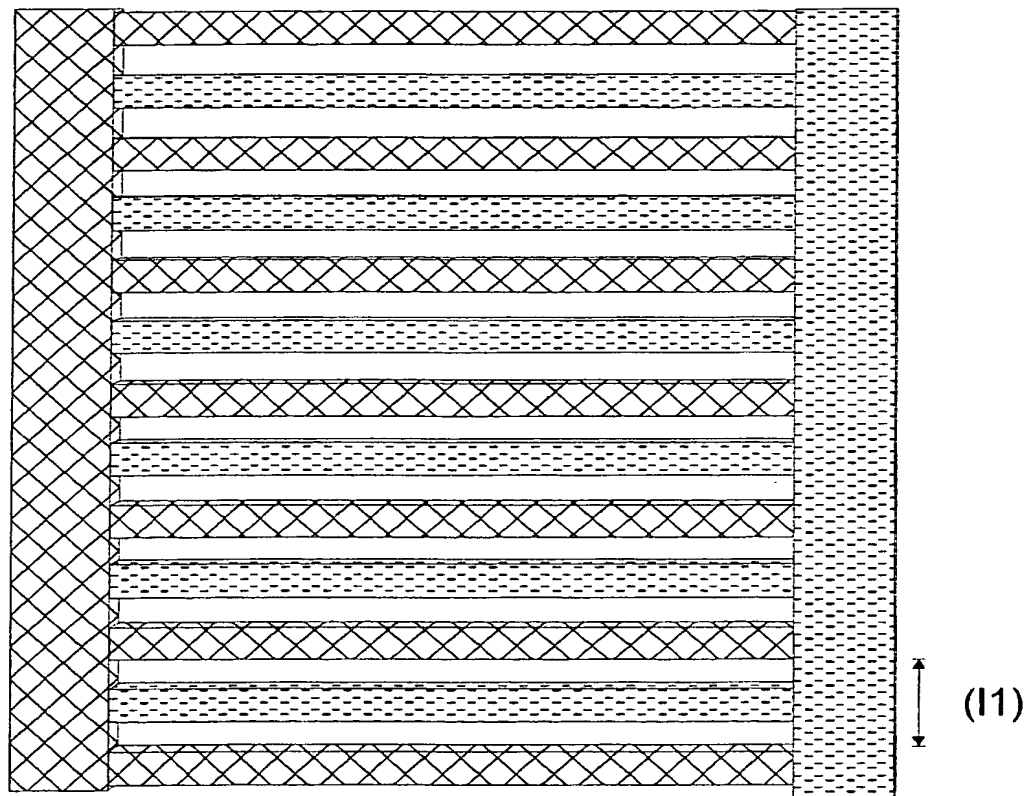


Fig. 2

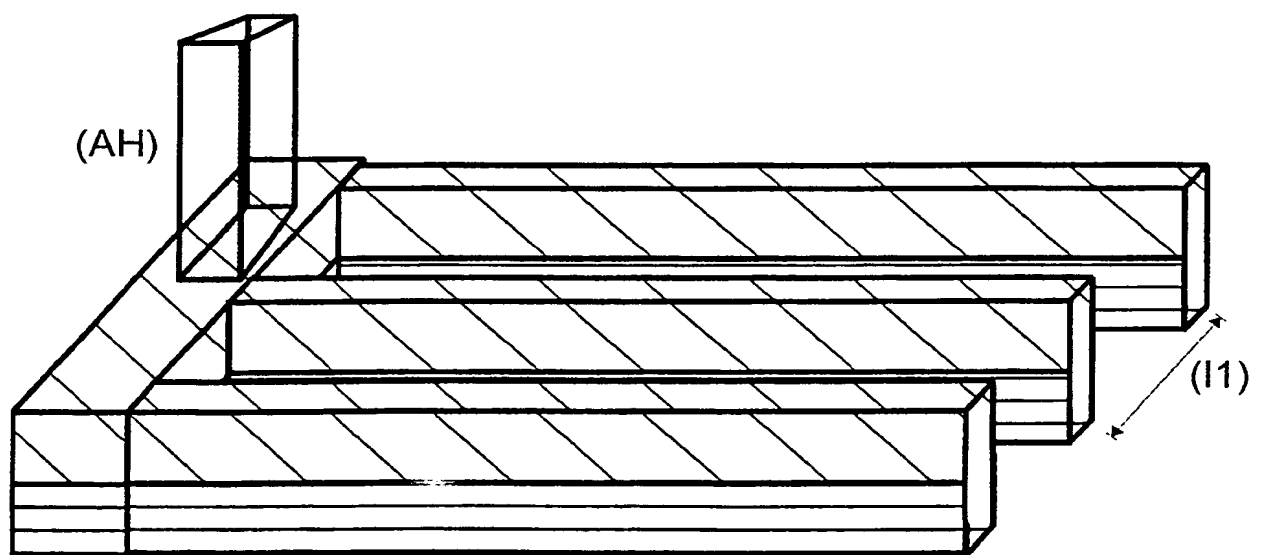


Fig. 3

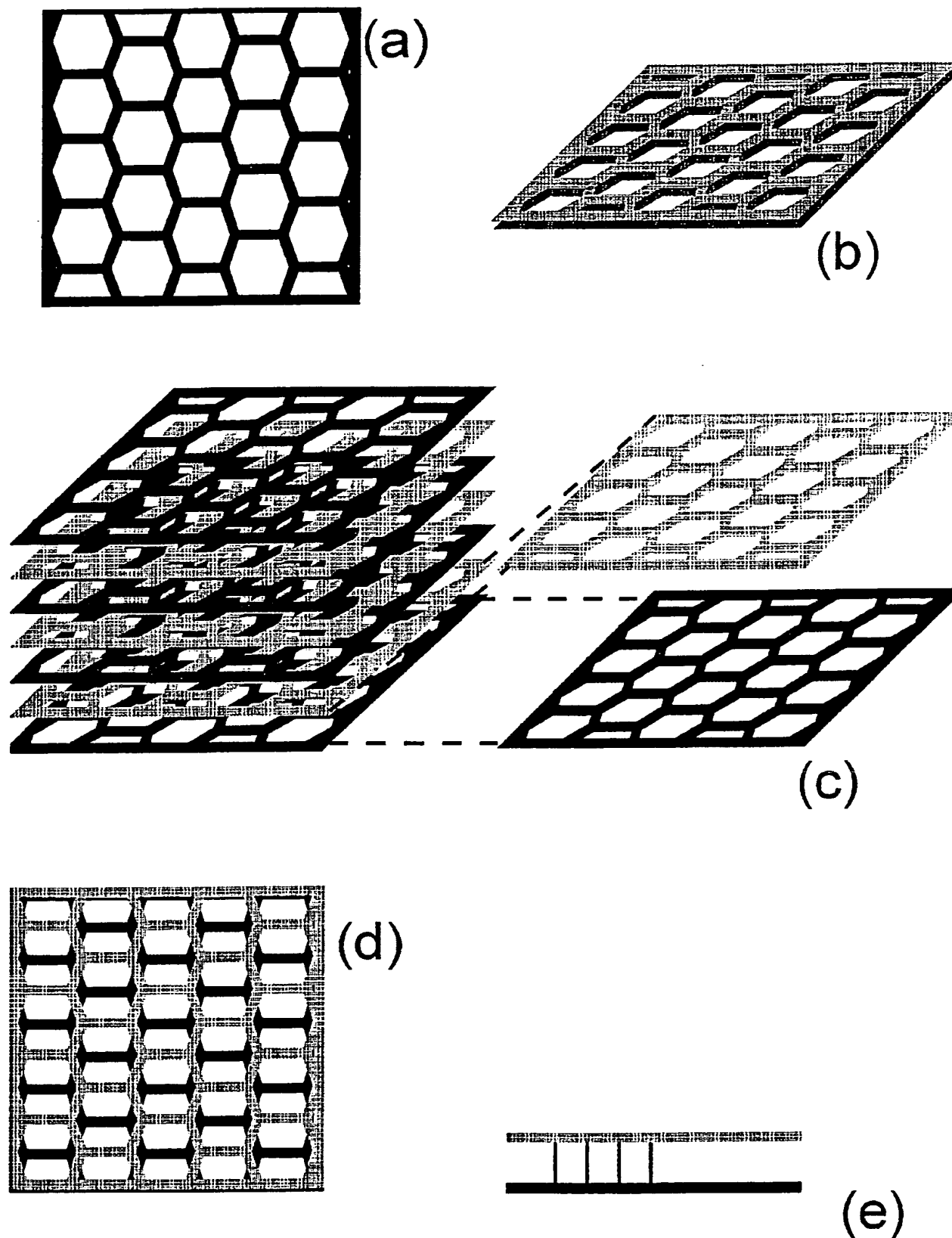


Fig. 4

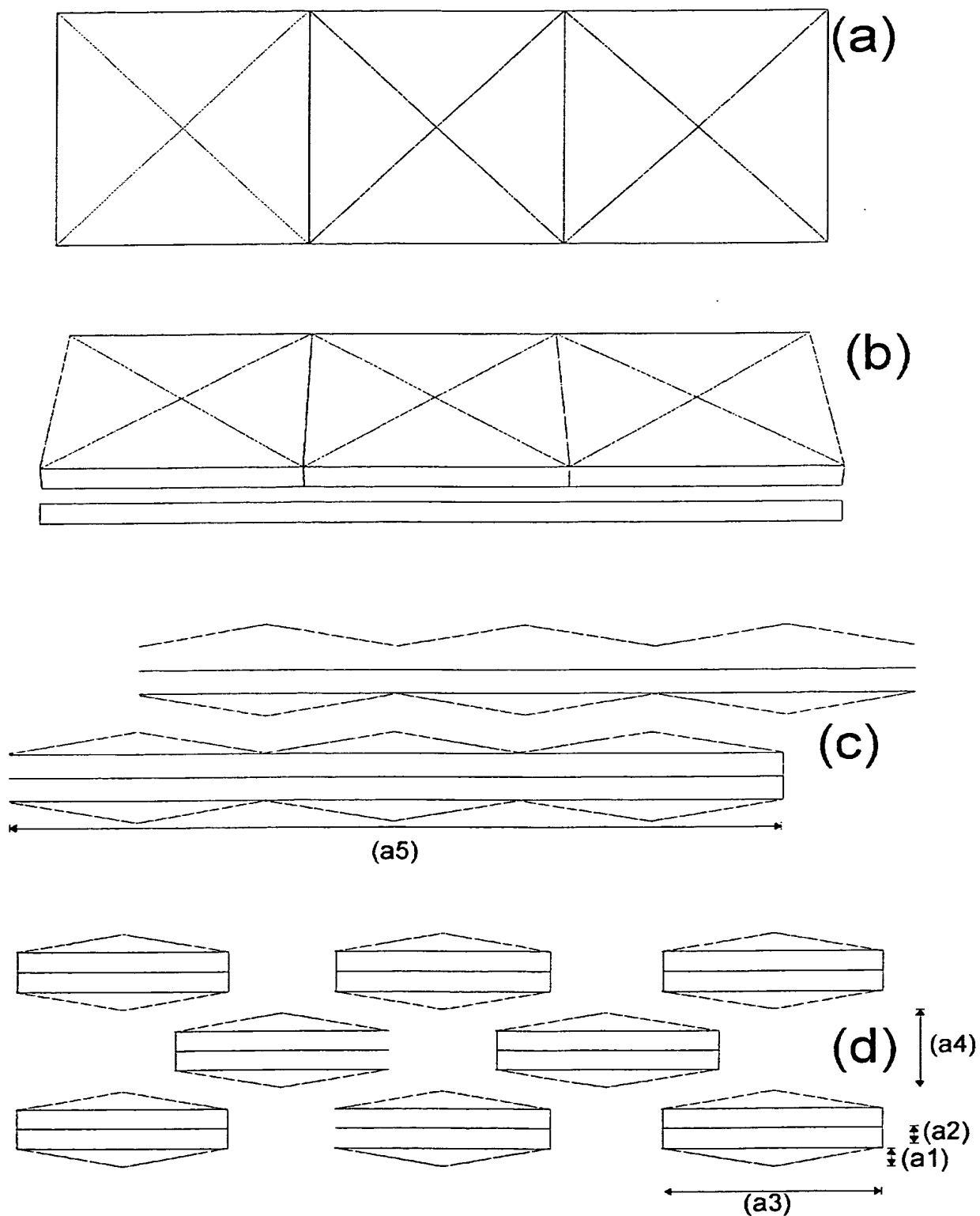


Fig. 5

Translation
09/926401

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

4

Applicant's or agent's file reference O.Z. 5444-WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/01913	International filing date (day/month/year) 04 March 2000 (04.03.00)	Priority date (day/month/year) 28 April 1999 (28.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/00		
Applicant CREAVIS GESELLSCHAFT FÜR TECHNOLOGIE UND INNOVATION MBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 November 2000 (21.11.00)	Date of completion of this report 11 September 2001 (11.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/01913

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-14, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-9, filed with the letter of 25 April 2001 (25.04.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/01913

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The amendments submitted to the International Bureau pursuant to PCT Article 19(1) are admissible under PCT Article 19(2).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01913

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Inventive step (IS)	Claims	none	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations

1. The present application relates to a cell carrier system for the three-dimensional culture of cells. The carrier system consists of individual modules which can be put together to produce a three-dimensional network-like or latticed carrier structure on which the cells can form organ-like three-dimensional structures. In so doing, the carrier structure forms a system of cavities (capillary system) through which the cell culture medium flows. The walls of the carrier system are porous so that the cells can be fed.

2. The report makes reference to the following documents:

D1: US-A-5 510 254 (NAUGHTON B.A. ET AL.), 23 April 1996 (1996-04-23), mentioned in the application.

D1 describes a three-dimensional cell culture system in a three-dimensional sponge-like carrier system formed by a three-dimensional array of biocompatible non-living filaments and cells bridging the spaces between the filaments. The system as a whole is washed round by a medium, that is, it is flushed

through via the sponge-like capillary system (capillary network), and enables a multi-layer tissue-like/organ-like growth of the cells (abstract; Claim 1; column 6, lines 51-54). A modular structure is not described.

D2: WO-A-97/12960 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM) 10 April 1997 (1997-04-10).

D2 describes a cell culture system with a three-dimensional carrier system into which hollow fibres are introduced (e.g. abstract). The cell culture system enables the formation of tissue-like multi-layer aggregates (Figs. 13-14). These three-dimensional carrier systems (modules) can be stacked one above the other in reactors to form larger three-dimensional objects and, due to the respective plates (half-shells), capillary spaces (capillary network) are produced through which the medium feeding the cells can flow (Fig. 2, 4, 10, 12).

D3: US-A-5 658 797 (BADER A.), 19 August 1997 (1997-08-19).

D3 describes stacked "culture slides" (modules) with capillary spaces forming a capillary system (capillary network) between respective plates (half-shells) via which the cells are fed with medium (Figs. 1, 2, 4) and grow in organ-like structures (column 3, lines 12-40).

D4: US-A-5 605 835 (HU W. ET AL.), 25 February 1997 (1997-02-25).

D4 describes a three-dimensional cell culture system comprising modules consisting of a cell chamber in which cells grow in a biocompatible three-dimensional matrix, said matrix being separated by permeable membranes from media chambers (that is, made up of half-shells) forming a capillary system (capillary network) in which a cell culture medium flows. These segments made up of half-shells are stacked in bioreactors to form larger three-dimensional objects (abstract, Fig. 1, Fig. 5).

3. The solution proposed in Claim 1 of the present application cannot be considered novel for the following reasons (PCT Article 33(2)):

Although the specific embodiments of the present application (see Fig. 1-5) appear to be delimited over the available prior art cited above, and advantageous properties such as high flexibility, three-dimensional growth and good vascularisation are plausible, this is not reflected in the wording of the claims.

The technical features such as "a cell carrier system comprising modularly shaped segments which are made up of half-shells, can be joined together to produce larger 3D objects, and form an artificial capillary network which enables substantially natural vascularisation" also characterise the prior art (D2-D4). Claims 1-3 and 8-9 in their present form therefore include the prior art. The prior art encompasses, in general terms, cell carrier systems made of porous (that is, with pores, permeable)

materials which enable three-dimensional growth of cells consisting of standardised units (modular segments), wherein, by combining the elements, capillaries (capillary network) are formed via which the medium feeds (vascularises) the cells (see D2-D4 under point 2).

In view of the current form of the independent claims, it does not appear appropriate to discuss the extent to which dependent Claims 4-7 might, on their own, substantiate novelty and inventive step, particularly since the advantageous properties of features such as pore size and distance between the modules only become clear within the overall concept. In themselves and/or in combination with the features of the bioreactors in D2-D4, these features hardly seem to make any contribution. Moreover, the specific distances between the pores and sizes also appear to be anticipated by the use of commercially available cell culture substrates/membranes.